

Wpłynęło 7.11.2017 r.  
Zrecenzowano 7.03.2018 r.  
Zaakceptowano 13.03.2018 r.  
A – koncepcja  
B – zestawienie danych  
C – analizy statystyczne  
D – interpretacja wyników  
E – przygotowanie maszynopisu  
F – przegląd literatury

## **ZNACZENIE MIKROORGANIZMÓW W ROZKŁADZIE ZWIĄZKÓW ROPOPOCHODNYCH W GLEBIE**

**Donata KOSICKA-DZIECHCIAREK<sup>AF</sup>,  
Agnieszka WOLNA-MARUWKA<sup>EF</sup>, Jean Bernard DIATTA<sup>EF</sup>**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii

### **Streszczenie**

Składniki ropy naftowej oraz produkty petrochemiczne o złożonej budowie stanowią istotne zagrożenie dla środowiska przyrodniczego. Największą szkodliwością w odniesieniu do ekosystemu charakteryzują się węglowodory aromatyczne, występujące w ropie naftowej, do których należy zaliczyć: benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny. Wyżej wymienione substancje wykazują negatywny wpływ na człowieka ze względu na właściwości kancerogenne i toksyczne. Źródłami skażenia związkami ropopochodnymi środowiska gruntowego najczęściej są: miejsca wydobywania ropy naftowej, zakłady rafineryjne i petrochemiczne, transport ropy naftowej i produktów naftowych, miejsca magazynowania oraz dystrybucji ropy i produktów ropopochodnych, bazy i obiekty wojskowe, transport lotniczy oraz miejsca przetwarzania odpadów ropopochodnych i zaolejonych. Do zanieczyszczenia środowiska może dochodzić długotrwale lub w sposób awaryjno-wyciekowy. Przyspieszenie rozkładu substancji ropopochodnych w glebie uzyskuje się w procesach stymulacji czynnikami fizykochemicznymi i/lub biologicznymi. W celu oczyszczenia gruntów z produktów ropopochodnych stosuje się proces bioremediacji, który polega na wykorzystaniu szlaków i cykli metabolicznych współdziałających ze sobą mikroorganizmów do ograniczenia zanieczyszczeń lub ich transformacji w formy, które są mniej szkodliwe. Usuwanie zanieczyszczeń gruntów związkami ropopochodnymi może następować w miejscu skażenia (*in situ*) lub po usunięciu zanieczyszczonej gleby z jej naturalnego pochodzenia (*ex situ*).

**Słowa kluczowe:** bioremediacja, mikroorganizmy, związki ropopochodne

---

**Do cytowania For citation:** Kosicka-Dziechciarek D., Wolna-Maruwka A., Diatta J.B. 2018. Znaczenie mikroorganizmów w rozkładzie związków ropopochodnych w glebie. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 18. Z. 1 (61) s. 57–68.

## WSTĘP

Postępująca urbanizacja i wzrost działalności przemysłowej przyczynia się do znacznej dewastacji środowiska przyrodniczego. Przywrócenie równowagi biologicznej gleby, powietrza i wód stało się więc priorytetem. Jednym z głównych źródeł zanieczyszczenia środowiska w Polsce jest ropa naftowa i jej pochodne. Według KORZENIOWSKIEJ-RAJMER [2001] oraz KOŹMIŃSKIEJ i in. [2014] ropa naftowa składa się z węglowodorów o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, chemicznych oraz fizycznych, zawiera niewielkie ilości związków organicznych tlenu (kwasy karboksylowe, fenole), siarki, azotu oraz metali ciężkich, takich jak: ołów (Pb), miedź (Cu), chrom (Cr), kadm (Cd), rtęć (Hg) i cynk (Zn) (do 1%). W skład ropy naftowej wchodzi grupy węglowodorów, takich jak: alkanany, parafiny, alkeny, olefiny, cykloalkany, cykloparafiny, węglowodory aromatyczne, oraz areny jednopierścieniowe (JWA), zwane w skrócie BTEX: benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny, a także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Obszary, które zostały skażone wyżej wymienionymi substancjami, zostają wykluczone z użytkowania rolniczego oraz stanowią istotne zagrożenie dla organizmów żywych ze względu na zmianę właściwości fizycznych i chemicznych gleby [KASZYCKI, KOŁOCZEK 2005; RADWAN i in. 2012].

Węglowodory aromatyczne występujące w ropie naftowej wywierają działanie mutagenne, cytotoksyczne, teratogenne oraz immunotoksyczne na organizmy żywe, ponieważ charakteryzują się zdolnością do kumulowania w roślinach i przedstawiania do kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego [CHANG i in. 2009; OKOH 2006]. Ponadto związki ropopochodne występujące w ropie naftowej wywierają niekorzystny wpływ na mikroorganizmy autochtoniczne, np. zmieniają skład taksonomiczny populacji bakterii uczestniczących w procesie ich rozkładu [CHIKERE i in. 2011; PALIWAL i in. 2012]. MARGESIN i in. [2007] stwierdzają, że mikroorganizmy autochtoniczne izolowane metodami hodowlanymi stanowią zaledwie 0,01–1% ogólnej liczby drobnoustrojów biorących udział w usuwaniu substancji ropopochodnych. Zdaniem KWAPISZ [1999] drobnoustroje autochtoniczne wykazują większe zdolności konkurencyjne ze względu na selekcję naturalną podczas zanieczyszczenia związkami ropopochodnymi. Charakteryzują się one zdolnościami degradacyjnymi, które powstały w toku ich ewolucji (poziomy transfer genów, mutacje), jednak ich aktywność i liczebność w środowisku jest mała.

W celu rekultywacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi wykorzystuje się metody chemiczne i fizyczne. Wspomniane metody polegają m.in. na ekstrakcji parą wodną, termicznej desorpcji oraz procesach utleniania i redukcji, a także chemicznym usuwaniu związków chlorowcowych. Mimo skuteczności, wyżej wymienione sposoby są często stosowane jako rozwiązania doraźne. Jediną metodą rekultywacji gruntów skażonych związkami ropopochodnymi, która przyczynia się do przekształcenia zanieczyszczeń w nieszkodliwe substancje, jest bioremediacja, uznana za bardzo efektywną i ekonomiczną [HERNANDEZ i in. 2002]. W celu osią-

gnięcia jak najlepszych efektów podczas oczyszczania gruntów skażonych związkami ropopochodnymi należy uwzględnić parametry fizyczne i chemiczne gleby, do których należy zaliczyć: pH, obecność tlenu, wilgotność gruntu oraz zawartość substancji biogenych [PALA i in. 2006]. Ponadto KRZYŚKO-ŁUPICKA i in. [2016] wykazali, że w celu bioremediacji gruntów skażonych związkami ropopochodnymi należy wykorzystywać mikroorganizmy o określonych właściwościach degradujących, a także należy określić budowę chemiczną związków zanieczyszczających oraz ich dostępność w środowisku.

## ŹRÓDŁA SKAŻEŃ ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI I RODZAJE MIKROORGANIZMÓW WPLYWAJĄCYCH NA ICH BIODEGRADACJĘ

Intensywna działalność człowieka skutkuje zwiększeniem zanieczyszczenia środowiska różnego rodzaju substancjami, m.in. związkami ropopochodnymi. Do głównych źródeł skażenia gleb związkami ropopochodnymi należy zaliczyć takie obiekty, jak: stacje paliw, rafinerie, urządzenia poszukiwawcze, bazy magazynowe, bazy przeładunkowe, tereny przemysłowe i poprzemysłowe oraz pojazdy samochodowe. Związki ropopochodne z wyżej wymienionych obiektów przedostają się do środowiska głównie poprzez pęknięcia zbiorników, nieszczelności rurociągów, niewłaściwą obsługę dystrybutorów, niesprawne systemy gromadzenia i zagospodarowania zużytych olejów i smarów, erozję zbiorników, a także poprzez mikrowycieki paliw podczas kolizji drogowych [BIEDROWSKI, TROĆ 1997; LATTUATI i in. 2002; RITALAHTI i in. 2005; SZTOMPKA 1999].

Węglowodory wchodzące w skład ropy naftowej, które są substancjami chemicznie stabilnymi, mogą być rozkładane przez drobnoustroje należące do różnych grup systematycznych, między innymi przez bakterie z rodzaju *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., *Anitratum* sp., *Vbrio-Aeromonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Rhodococcus* sp.), drożdże (*Debaromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp., *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Trichosporon* sp.) oraz grzybów (*Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Varicospora* sp., *Sporotrichum* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Mortierella* sp., *Rhizopus* sp., *Psilocybe* sp., *Smittium* sp., *Candidia* sp.) [ANTIZAR i in. 2004; WATKINSON, MORGAN 1991]. Według KORDY i in. [1997] w celu bioremediacji gruntów skażonych związkami ropopochodnymi częściej stosuje się różnego rodzaju bakterie, które – w przeciwieństwie do drożdży i grzybów – charakteryzują się szybkim wzrostem i dużą liczebnością w glebie. Ponadto są łatwe w hodowli i podatne na manipulacje genetyczne. Grzyby i bakterie stosowane do biologicznego odkażania

gleby wymagają glukozy lub celulozy (substratu wzrostu) i transformują węglowodory naftowe najczęściej katabolicznie, a tempo biodegradacji jest małe. Omawiane organizmy nie metabolizują dalej produktów, dlatego dalsza mineralizacja związków ropopochodnych zachodzi z udziałem bakterii [PRENAFETA-BOLDU i in. 2002]. Biodegradacja większości substancji ropopochodnych w środowisku wodnym lub gruntowym przebiega z udziałem wielu grup mikroorganizmów współpracujących ze sobą – od wybitnie tlenowych do bezwzględnych beztlenowców. Należy jednak zaznaczyć, że szybszy i bardziej kompletny rozkład związków ropopochodnych przebiega w warunkach tlenowych [WIDDEL, RABUS 2001]. KASZYCKI i KOŁOCZEK [2005] stwierdzili, że rozkład związków ropopochodnych w glebie jest procesem długotrwałym, zależnym od rodzaju skażenia, koncentracji i stopnia toksyczności oraz bytującej tam mikroflory. Według MROZIK i in. [2005] aktywność mikroorganizmów w procesie biodegradacji jest zależna od szczepu i w związku z tym istnieje konieczność identyfikacji genetycznej populacji drobnoustrojów w zanieczyszczonym środowisku.

### PARAMETRY FIZYCZNO-CHEMICZNE WPLYWAJĄCE NA PROCES BIOREMEDIACJI

W przypadku skażeń o dużej toksyczności może dojść do znacznego ograniczenia życia biologicznego w glebie. W takich sytuacjach należy wprowadzić do gleby aktywne mikroorganizmy, które będą tolerowały warunki panujące w zanieczyszczonym środowisku [KASZYCKI, KOŁOCZEK 2005]. Również w celu zintensyfikowania biologicznego procesu oczyszczania gruntów skażonych związkami ropopochodnymi możliwe jest zastosowanie odpowiednio dobranych zespołów mikroorganizmów współdziałających ze sobą, które rozkładają określone typy zanieczyszczeń [KLIMIUK, ŁEBKOWSKA 2003; SIUTA 1997]. Zdaniem KASZYCKIEGO i in. [2001] biocenozy to tzw. biopreparaty, w skład których wchodzi odpowiednie gatunki mikroorganizmów wprowadzane do gleby w postaci *inoculum* (szczepionki biologiczne). Wchodzące w skład biopreparatów mikroorganizmy są specjalnie wyselekcjonowane ze środowiska naturalnego i przyczyniają się do znacznej poprawy skuteczności procesu likwidacji skażeń. Omawiane szczepionki w swoim składzie zawierają około  $10^9$  komórek na  $\text{cm}^3$  preparatu [KASZYCKI, KOŁOCZEK 2005]. Dla efektywnej bioremediacji gruntów skażonych związkami ropopochodnymi minimalna liczebność mikroorganizmów w glebie powinna wynosić  $10^5$  komórek na g s.m. gruntu [KLIMIUK, ŁEBKOWSKA 2003].

Według KLIMIUK i ŁEBKOWSKIEJ [2003] monitorowanie procesu bioremediacji gruntów z zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi polega na przeprowadzeniu analiz fizykochemicznych i mikrobiologicznych. Do kontroli omawianego procesu, w celu określenia ilości związków ropopochodnych, wykorzystuje się metody chromatografii gazowej i spektrofotometrii w podczerwieni. Monitorowanie stop-

nia skażenia związkami ropopochodnymi według wyżej wymienionych autorów obejmuje również określenie wilgotności, zawartości składników odżywczych, oznaczenie ilościowe i jakościowe populacji mikroorganizmów oraz wartości pH. Dzięki znajomości omawianych parametrów możliwe jest podjęcie decyzji o wyborze odpowiednich mikroorganizmów, które będą skuteczne w procesie usuwania związków ropopochodnych z gleby.

HARRISON (red.) [2003] oraz KOPYTKO i IBARRA MOJICA [2009] wykazują, że w procesie bioremediacji najważniejszym parametrem jest wartość pH, która powinna mieścić się w zakresie od 6,5 do 8,0. Związki ropopochodne występujące w skażonej glebie mogą przyczyniać się do zmniejszenia wartości pH poprzez powstające kwasy w wyniku degradacji węglowodorów. Zwiększenie wartości pH gleby jest możliwe przez wapnowanie [NOWAK 2008].

Zdaniem VIDALI [2001] optymalna temperatura do przeprowadzania procesu bioremediacji przez mikroorganizmy wynosi 20–30°C, natomiast optymalna wilgotność względna gleby 30–90%. Według KLUK [2010] w procesie bioremediacji ważna jest obecność składników odżywczych, które wywierają wpływ na tempo procesu biodegradacji. Do głównych składników odżywczych należy zaliczyć azot i fosfor. Według wyżej wymienionej autorki w przypadku deficytu składników odżywczych limitujących efektywność bioremediacji stosuje się nawozy zawierające azot i fosfor, co przyspiesza omawiany proces. Według OLAŃCZUK-NEYMAN i in. [1994] w wierzchniej warstwie gleby o odpowiednim stosunku C:N:P występuje od  $10^7$  do  $10^9$  komórek drobnoustrojów na g gruntu, z których od 0,1 do 1,0% to organizmy zdolne do rozkładu związków ropopochodnych. Mikroorganizmy wykorzystywane do bioremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi muszą charakteryzować się zdolnością do degradacji skażenia, szybkością namnażania w skażonym obszarze, dużą konkurencyjnością w stosunku do mikroflory autochtonicznej oraz umiejętnością zdominowania obszaru skażonego omawianymi substancjami toksycznymi [DELLAGNEZZE i in. 2014; SUJA i in. 2014]. Związki organiczne występujące w paliwach oraz olejach, w których rozpuszczone są toksyczne dodatki uszlachetniające, WWA, oraz chlorowcopochodne, charakteryzują się zdolnościami do migracji, stwarzając zagrożenie dla wód gruntowych.

## **BIOREMEDIACJA GRUNTÓW SKAŻONYCH ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI**

Przed przystąpieniem do bioremediacji gruntów skażonych związkami ropopochodnymi należy określić na podstawie analiz fizykochemicznych zdolność zanieczyszczeń do degradacji mikroorganizmów mogących rozkładać omawiane substancje toksyczne oraz ich liczebności. Zdaniem KLIMIUK i ŁEBKOWSKIEJ [2003] podczas doboru metody bioremediacji należy zwrócić również uwagę na rozpusz-

czalność w wodzie związków ropopochodnych i ich reaktywność z innymi składnikami środowiska.

Bioremediacja gruntów, które zostały skażone omawianymi substancjami na skutek wydobycia ropy naftowej lub w miejscach awarii, stało się priorytetem. Wyżej wymieniona technika łączy ze sobą osiągnięcia mikrobiologii z ekologią mikroorganizmów, biochemią, genetyką i chemią [MROZIK i in. 2005]. Oczyszczanie gleby skażonej związkami ropopochodnymi może przebiegać samorzutnie, jednak jest to często proces długotrwały, podczas którego może dochodzić do spontanicznych reakcji fizykochemicznych, prowadzących do rozkładu skażeń.

Mikroorganizmy wykazują zdolności do bioremediacji zanieczyszczeń poprzez unieszkodliwienie substancji ropopochodnych na skutek rozkładu i utlenienia (biodegradacja), przyswojenia (asymilacja) lub przekształcenia związków chemicznych w nietoksyczne (biotransformacja) [KASZYCKI, KOŁOCZEK 2005]. Usuwanie zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi może odbywać się w miejscu powstania (*in situ*) lub poza miejscem skażenia (*ex situ*) poprzez wybranie skażonego gruntu i umieszczenie w specjalnie przygotowanych miejscach lub odpompowanie skażonej wody [RADWAN i in. 2012; VIDALI 2001]. Technologię *in situ* wykorzystuje się w sytuacji, kiedy nie ma możliwości usunięcia skażonej gleby. Przykładem mogą być obszary, które są przeznaczone pod budownictwo dróg, lub miejsca awarii pod rurociągami lub instalacjami. Do głównym metod bioremediacji gruntów za pomocą metody *in situ* (w miejscu) należy zaliczyć: uprawę gleby, bioekstrakcję i bio-wentylację.

MROZIK i in. [2005] do biologicznych metod oczyszczania gruntów zaliczają bioattenuację (bioremediację naturalną), która połączona jest z monitorowaniem stężenia związków ropopochodnych, biostymulację, polegającą na stymulowaniu mikroflory autochtonicznej za pomocą warunków środowiskowych (stosunku C:N:P, tlenu) i bioaugmentację bazującą na wykorzystaniu specyficznych mikroorganizmów. Według wyżej wymienionych autorów mikroorganizmy wykorzystywane w przypadku bioaugmentacji powinny przejawiać zdolności do adhezji, możliwości penetracji oraz silnej konkurencyjności wobec mikroflory autochtonicznej. Ponadto powinny się charakteryzować elastycznością w stosunku do warunków środowiskowych. W przeciwieństwie do biostymulacji proces bioaugmentacji rozpoczyna się niezwłocznie po inokulacji. W przypadku biostymulacji, gdzie najpierw gleba jest wzbogacana związkami odżywczymi, wymagany jest dłuższy czas adaptacji mikroorganizmów w nowych warunkach [GENTRY i in. 2004].

W technologii *ex situ* (poza miejscem skażenia) możliwe jest skuteczniejsze wykorzystanie procesów intensyfikujących rozkład związków ropopochodnych, co prowadzi do znacznego skrócenia czasu oczyszczania gruntów z omawianych substancji. Stosowanie techniki *ex situ* umożliwia przebieg procesu w krótkim czasie, a także ułatwia jego kontrolę. Do metod *ex situ* należy zaliczyć: sposób uprawy gleby, kompostowanie oraz bioreaktory i biostosy [KLIMIUK, ŁEBKOWSKA 2003;

VAN GESTEL i in. 2003; VIDALI 2001]. Uprawa gleby polega na wykopaniu gruntu skażonego związkami ropopochodnymi, a następnie na rozłożeniu go na odpowiednio przygotowanej powierzchni, co prowadzi do stymulacji wzrostu i rozwoju mikroorganizmów autochtonicznych i biodegradacji ropopochodnych. Zastosowanie kompostowania polega na wprowadzeniu do skażonej gleby np. odpadów rolniczych, które wpływają na rozwój drobnoustrojów, przyczyniających się do rozkładu związków toksycznych.

Z kolei biostosy stosuje się tylko w przypadku powierzchniowego zanieczyszczenia ropą naftową. Jest to połączenie sposobu uprawy gleby z kompostowaniem. Ostatnią techniką bioremediacji *ex situ* są bioreaktory. Do tej metody wykorzystywane są zbiorniki, wewnątrz których zachodzi proces prowadzący do stymulacji aktywności i rozwoju mikroorganizmów, przyczyniających się do biodegradacji omawianych związków toksycznych [VAN HAMME i in. 2003; VIDALI 2001].

Podczas doboru odpowiedniej metody bioremediacji głównym kryterium są finanse. Największym nakładem finansowym charakteryzuje się bioremediacja *ex situ*, przeprowadzona z użyciem bioreaktorów. Mniejszych nakładów finansowych wymaga oczyszczanie gleby za pomocą kompostowania czy też uprawy roli.

Przebieg procesu bioremediacji zależy od stopnia skażenia gruntu związkami ropopochodnymi, których dostępność dla mikroorganizmów może być zmniejszona wskutek ich adsorpcji przez składniki glebowe, co może w znacznym stopniu ograniczyć, a nawet wykluczyć bioremediację. Efekt omawianego procesu w głównej mierze zależy od stężenia węglowodorów w produktach naftowych, co jest ściśle związane z ich stopniem toksyczności [PODSIADŁO, KRZYŚKO-ŁUPICKA 2013]. CHIKERE i in. 2011] wykazują, że skuteczność bioremediacji można ocenić poprzez określenie stopnia podatności wszystkich zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi na degradację biologiczną, chemiczne oznaczenie poziomu składników środowiska, określenie trwałości produktów degradacji środowiska oraz poznanie specyficznych genów drobnoustrojów, które biorą udział w katabolizmie zanieczyszczeń.

## MECHANIZMY ROZKŁADU ZWIĄZKÓW ROPOPOCHODNYCH W GLEBIE

Według KWAPISZ [1999] w rozkładzie związków ropopochodnych bardzo istotna jest szybkość adaptacji mikroorganizmów w skażonym środowisku. Zdaniem wyżej wymienionej autorki zdolność rozkładu omawianych związków przez drobnoustroje jest zależna od funkcjonowania systemów ich transportu do komórki, potencjału genetycznego, pozwalającego na wprowadzenie tlenu do cząsteczki węglowodoru, substratowej specyficzności oksygenaz i monoooksygenaz. W celu przeprowadzenia biodegradacji bardzo istotny jest także sposób funkcjonowania mechanizmu indukowania enzymów, do których należą: dehydrogenazy, hydrolazy

i dekarboksylazy. BOOPATHY [2000] wykazuje, że szybkość rozkładu omawianych substancji toksycznych w powierzchniowych warstwach gruntu zachodzi z prędkością od 0,002 do 0,4 g·kg<sup>-1</sup> gruntu na dobę, natomiast w głębszych warstwach gleby szybkość rozkładu związków ropopochodnych maleje, ponieważ zmniejszeniu ulega stężenie tlenu i liczba drobnoustrojów.

Niektóre z grup drobnoustrojów rozkładających związki ropopochodne są metabolicznie uniwersalne, co oznacza, że zdolne są do degradacji szerokiego spektrum substratów. Według PODSIADŁY i KRZYŚKO-ŁUPICKIEJ [2013] za katabolicznie uniwersalne uważane są głównie bakterie przyczyniające się do degradacji fenolu, np. *Pseudomonas* sp. (degradujący toluen, fenol, naftalen, bifenyle, polichlorowane oraz dioksyny), *Bacillus* sp., *Xanthomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas* sp. Według BAJ i MARKIEWICZA [2006] bakterie poprzez wieloskładnikową dioksygenazę zapoczątkowują utlenianie pierścienia węglowodorów. Powstaje cis-dihydrodiol, który ulega rearomatyzacji poprzez udział dehydrogenazy cis-dihydrodiolu do pochodnych dihydroksylowych. Kolejne etapy utleniania prowadzą do powstania 1,2-dihydroksybenzenu lub 3,4-dihydroksybenzenu (kwasu protokatechowego). Dalej następuje oksydacyjne otwarcie pierścienia aromatycznego w pozycji *meta* lub *orto* powstałych produktów z udziałem dioksygenaz. W przypadku szlaku *meta* dochodzi do otwarcia pierścienia między węglem hydroksylovanym a niehydroksylovanym i powstaje semialdehyd kwasu 2-hydroksymukonowego. W szlaku *orto* rozszczepieniu ulegają wiązania C–C między dwoma hydroksylovanymi atomami węgla, co skutkuje powstaniem kwasu *cis,cis*-mukonowego. Kolejny etap rozkładu polega na utlenieniu powstałego łańcucha alifatycznego do intermediatów cyklu Krebsa, do których należy bursztynian, acetylo-CoA i pirogronian [BAJ, MARKIEWICZ 2006; CHIKERE i in. 2011; GREŃ i in. 2008; VAN HAMME i in. 2003; VIGNESH i in. 2011].

Grzyby ligninolityczne i nieligninolityczne przyczyniają się do utlenienia pierścieni aromatycznych do tlenków arenu za pomocą monoooksygenaz. Enzymy grzybów ligninolitycznych wykazują zdolności do cięcia i mineralizowania pierścieni aromatycznych w przeciwieństwie do grzybów nieligninolitycznych, z których niewiele przejawia możliwości degradowania WWA do CO<sub>2</sub>. Ponadto grzyby ligninolityczne zawierają enzymy zewnątrzkomórkowe działające na szeroką gamę WWA [ZHANG, BENNETT 2005].

## PODSUMOWANIE

Ze względu na rozwój infrastruktury oraz przemysłu motoryzacyjnego problem zanieczyszczenia związkami ropopochodnymi stał się jednym z największych zagrożeń dla środowiska glebowego i wodnego, co wymaga szczególnego podejścia. Istotne jest zatem prowadzenie licznych badań mających na celu poznanie składników związków ropopochodnych oraz ich szlaków biodegradacji. Celowe jest rów-



niez określenie wpływu omawianych substancji toksycznych na liczebność, różnorodność i aktywność drobnoustrojów. Należy zatem podejmować próby zmniejszenia znacznych ilości związków ropopochodnych w glebie poprzez poszukiwanie skutecznych metod ich utylizacji, które nie będą wpływały negatywnie na środowisko, a zarazem będą ograniczały migrację omawianych substancji toksycznych. Rozkład biologiczny związków ropopochodnych jest możliwy poprzez zastosowanie metod oczyszczania gruntów (*in situ* lub *ex situ*). Ich wybór zależy od wielu czynników środowiskowych, rodzaju skażenia, a także kosztów związanych z bioremediacją. Metoda *in situ* stosowana jest zazwyczaj w przypadku braku możliwości usunięcia skażonej gleby. W przypadku likwidacji skażeń metodą *in situ* konieczna jest znajomość geologiczna struktury gruntu, topografii skażeń, kierunku przemieszczania się wód gruntowych oraz podjęcie licznych działań mających na celu stworzenie optymalnych warunków do rozwoju mikroorganizmów, które wywierają istotny wpływ na funkcjonowanie środowiska glebowego. Naturalny rozkład związków ropopochodnych przez mikroflorę autochtoniczną jest procesem długoterminowym. Proces ten można zintensyfikować poprzez wprowadzenie do skażonej gleby specjalnie wyselekcjonowanych mikroorganizmów w formie biopreparatów, przyspieszających rozkład ropopochodnych. Jednak skuteczniejszym sposobem degradacji jest zastosowanie metody *ex situ*, która – pomimo większych kosztów związanych z wywozem gleby – umożliwia efektywniejsze przeprowadzenie zabiegów bioremediacji skażeń związkami ropopochodnymi. Ponadto do zalet omawianej metody należy m.in. łatwy dostęp do gleby uformowanej w postaci przyzmy, łatwość w kontrolowaniu procesów oczyszczania oraz kontrola parametrów zapewniających korzystny rozwój mikroorganizmów.

## BIBLIOGRAFIA

- ANTIZAR-LADISLAO B., LOPEZ-REAL J., BECK A. 2004. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. No 34 (3) s. 249–289.
- BAJ J., MARKIEWICZ Z. 2006. *Biologia molekularna bakterii [Molecular biology of bacteria]*. Warszawa. Wydaw. Nauk. PWN. ISBN 978-83-01-18183-3 ss. 546.
- BIEDROWSKI Z., TROĆ M. 1997. Zanieczyszczenia gruntów i wód gruntowych substancjami ropopochodnymi na wybranych stacjach paliw CPN w Wielkopolsce [Pollution of land and ground water with petroleum derivatives on selected CPN fuel stations in Wielkopolska]. W: *Współczesne problemy hydrologii*. Red. J. Górski, E. Liszkowska. T. 8. Wrocław. WIND – J. Wojewoda s. 261–264.
- BOOPATHY R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. Vol. 74. Iss. 1 s. 63–67.
- CHANG B.V., LU Z.J., YUAN S.Y. 2009. Anaerobic degradation of nonylphenol in subtropical mangrove sediments. *Journal of Hazardous Materials*. No 165 s. 162–167.
- CHIKERE C.B., OKPOKWASILI G.C., CHIKERE B.O. 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*. No 1 s. 117–138.

- DELLAGNEZZE B.M., SOUSA G.V., MARTINS L.L., DOMINGOS D.F., LIMACHE E.E.G., VASCONCELLOS S.P., CRUZ G.F, OLIVEIRA V.M. 2014. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Marine Pollution Bulletin*. No 89 (1–2) s. 191–200.
- GENTRY T.J., RENSING C., PEPPER I.L. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. No 34 s. 447–494.
- GREŃ I., GUZIK U., WOJCIESZYŃSKA D., ŁABUZEK S. 2008. Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych [Molecular basis for the decomposition of xenobiotic aromatic compounds]. *Biotechnologia*. Nr 2 (81) s. 58–67.
- HARRISON R.M. (red.) 2003. El medio ambiente: Introduccion a la quimica medioambiental y a la contaminacion. Zaragoza. Acirbia. ISBN 84-200096-6-0 ss. 214.
- HERNANDEZ D., PLAZA C., POLO A. 2002. Consideraciones generales sobre la contaminación y restauración de suelos. *Residuos*. No 67 s. 123–134.
- KASZYCKI P., KOŁOCZEK H. 2005. Biotechnologie stosowane w odnowie gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi [Biotechnologies used in the regeneration of soils contaminated with petroleum substances]. W: *Ochrona środowiska naturalnego w XXI wieku – nowe wyzwania i zagrożenia*. Red. K. Wiecha, H. Kołoczek, P. Kaszycki. Kraków. Fundacja na rzecz Wspierania Badań Naukowych Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie s. 41–56.
- KASZYCKI P., SZUMILAS P., KOŁOCZEK H. 2001. Biopreparat przeznaczony do likwidacji środowiskowych skażeń węglowodorami i ich pochodnymi [Biopreparat for the removal of environmental contamination with hydrocarbons and their derivatives]. *Inżynieria Ekologiczna*. Nr 4 s. 15–22.
- KLIMIUK E., ŁEBKOWSKA M. 2003. Biotechnologia w ochronie środowiska [Biotechnology in environmental protection]. Warszawa. Wydaw. Nauk. PWN s. 131–198.
- KLUK D. 2010. Badania szybkości biodegradacji substancji ropopochodnych w odpadach wiertniczych [Study of the speed of biodegradation of petroleum substances in drilling waste]. *Nafta–Gaz*. Nr 6 (1) s. 27–33.
- KOPYTKO M., IBARRA MOJICA D.M. 2009. Możliwości biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach zanieczyszczonych przez przemysł naftowy [Biodegradability of petroleum hydrocarbons in soils contaminated by the petroleum industry]. *Inżynieria Mineralna*. Nr 7(12) s. 31–48.
- KORDA A., SANTAS P., TENENTE A., SANTAS R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*. No 48(6) s. 677–686.
- KORZENIOWSKA-REJMER E. 2001. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na charakterystykę geotechniczną gruntów stanowiących podłoże budowlane [Effect of petroleum pollutants on the geotechnical characteristics of land constituting the construction base]. *Inżynieria Morska i Geotechnika*. Nr 2 s. 83–86.
- KOŹMIŃSKA A., HANUS-FAJERSKA E., MUSZYŃSKA E. 2014. Możliwości oczyszczania środowisk wodnych metodą ryzofiltracji [Possibilities of water purification using the rhizofiltration method]. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. T. 14. Z. 3(47) s. 89–98.
- KRZYŚKO-ŁUPICKA T., KRĘCIDŁO M., KRĘCIDŁO Ł. 2016. Stymulacja rozkładu substancji ropopochodnych w skażonej glebie z wykorzystaniem nadtlenu wodoru i szczepionki *Yarrowia lipolytica* A 101 [Stimulating decomposition of petroleum substances in contaminated soil using water hydrocarbon peroxide and *Yarrowia lipolytica* A 101 vaccine]. *Inżynieria Ekologiczna*. Nr 9 s. 56–65.
- KWAPISZ E. 1999. Problemy biodegradacji ropy naftowej [Problems of biodegradation of oil]. I Krajowy Kongres Biotechnologii. 14 sekcja: Biotechnologia w ochronie środowiska. Wrocław s. 227–229.

- LATTUATI A., METZGER P., ACQUAVIVA M., BERTRAND J.C., LARGEAU C. 2002. n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain  $\beta$ -hydroxy acids as indicator of bacterial acidity. *Organic Geochemistry*. No 33 s. 37–45.
- MARGESIN R., HAMMERLE M., TSCHERKO D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers and incubation time. *Microbial Ecology*. No 53 s. 259–269.
- MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUŹEK S. 2005. Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments. *Postępy Mikrobiologii*. No 44 (3) s. 227–238.
- NOWAK J. 2008. Bioremediacja gleby z ropy i jej produktów [Bioremediation of soil from oil and its products]. *Biotechnologia*. Nr 1(80) s. 97–108.
- OKOH A.I. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. No 1 s. 38–50.
- OLANCZUK-NEYMAN K., PREJZNER J., TOPOLNICKI M. 1994. Chemiczna i bakteriologiczna ocena skażenia gruntów stacji przeladunku paliw produktami ropopochodnymi [Chemical and bacteriological evaluation of the land confiscation of fuel filling stations with petroleum products]. *Biotechnologia*. Nr 2 s. 50–59.
- PALA D.M., CARVALHO D.D., PINTO J.C., SANT'ANNA G.L. 2006. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. No 58 (3–4) s. 254–260.
- PALIWAŁ V., PURANIK S., PUROHIT H.J. 2012. Integrated perspective for effective bioremediation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. No 166 s. 903–924.
- PODSIADŁO Ł., KRZYŚKO-ŁUPICKA T. 2013. Techniki bioremediacji substancji ropopochodnych i metody oceny ich efektywności [Techniques of bioremediation of petroleum substances and methods of assessing their effectiveness]. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*. Nr 16 (4) s. 459–476.
- PRENAFETA-BOLDÚ F. X., VERVOORT J., GROTENHUIS J. T. C., VAN GROENESTIJN J.W. 2002. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T. 1. *Applied and Environmental Microbiology*. No 68(6) s. 2660–2665.
- RADWAN K., ŚLOSORZ Z., RAKOWSKA J. 2012. Efekty środowiskowe usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych [Environmental effects of the removal of petroleum pollutants]. *Bezpieczeństwo i Technika Pożarnicza*. Nr 3 s. 107–114.
- RITALAHTI K.M., LOFFLER F.E., RASCG E.F., KOENIGSBERG S. 2005. Bioaugmentation for chlorinated ethane detoxification: Bioaugmentation and molecular diagnostics in the bioremediation of chlorinated ethane-contaminated sites. *Industrial Biotechnology*. No 1 s. 114–118.
- SIUTA J. 1997. Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i w odpadach. I konferencja naukowo-techniczna. *Wysowa Zdrój*. Wydaw. Ekoinżynieria s. 119–130.
- SUJA F., RAHIM F., TAHA M.R., HAMBALI N., RIZAL RAZALI M., KHALID A., HAMZAH A. 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and Biodegradation*. No 90 s. 115–122.
- SZTOMPKA E. 1999. Biodegradation of engine oil in soil. *Acta Microbiologica Polonica*. No 31 s. 185–196.
- VAN GESTEL K., MERGAERT J., SWINGS J., COOSEMANS J., RYCKERBOER J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*. No. 125 s. 361–368.
- VAN HAMME J.D., SINGH A., WARD O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. No 67 (4) s. 503–549.
- VIDALI M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. No 73 s. 1163–1172.

- VIGNESH R., BADHUL HAQ M.A., SRINIVASAN M. 2011. Biodegradation prospective of microbes. International Journal of Environmental Science. No 2 (2) s. 741–754.
- WATKINSON R.J., MORGAN P. 1991. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. W: Physiology of biodegradative microorganisms. Red. C. Ratledge. Springer Netherlands s. 79–92.
- WIDDEL F., RABUS R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current opinion in biotechnology. No 12(3) s. 259–276.
- ZHANG CH., BENNETT G.N. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. No 67 s. 600–618.

Donata KOSICKA-DZIECHCIAREK, Agnieszka WOLNA-MARUWKA, Jean Bernard DIATTA

### THE ROLE OF MICROORGANISMS IN THE DECOMPOSITION OF PETROLEUM PRODUCTS IN SOIL

**Key words:** bioremediation, microorganisms, petroleum compounds

#### S u m m a r y

Diversified and specific components of petroleum and petrochemical products are a significant threat to the natural environment. Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes are aromatic hydrocarbons which can be found in petroleum. They are particularly harmful because of their carcinogenicity and toxicity for people and the ecosystem. The contamination of the soil environment with petroleum products is usually caused by oil extraction sites, refineries and petrochemical plants, transport, storage and distribution of oil and petroleum products, military bases and facilities, air transport and places where petroleum and oily waste is stored. The environment may be polluted successively in a long-term process or due to breakdowns resulting in leaks. Due to numerous dangers caused by petroleum products land decontamination has become a necessity. The decomposition of petroleum products in soil can be accelerated by stimulation with physiochemical and/or biological agents. Petroleum products can be eliminated in the process of land bioremediation, which consists in using the metabolic pathways and cycles of interacting microorganisms to reduce contaminations or transform them into less harmful products. Groups of microorganisms which participate in bioremediation are called biocenoses or consortiums of microorganisms. The elimination of petroleum products from soil can take place at the place of contamination (*in situ*) or after removal of contaminated soil from its natural location (*ex situ*).

**Adres do korespondencji:** mgr inż. D. Kosicka-Dziechciarek, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, e-mail: dkosicka@gmail.com